ThromboStep (2.ª generación): kit de detección de inmunoglobulina asociada a plaquetas (kit PAIg)

REF

TBS-50T

50 pruebas

CE IVD

INTRODUCCIÓN

Un recuento plaquetario normal oscila entre 150 000 y 450 000 plaquetas por microlitro de sangre en humanos. La trombocitopenia es la presencia de un número relativamente bajo de plaquetas en la sangre. La disminución del recuento plaquetario puede deberse a diversos procesos patológicos; la cuantificación de la inmunoglobulina asociada a las plaquetas permite determinar si la causa de la trombocitopenia es una disminución de la tasa de producción plaquetaria o un aumento de la tasa de destrucción.

MATERIALES SUMINISTRADOS

El kit incluye:

- 1 vial de anticuerpo monoclonal anti-CD42a PE. Recomendado para su uso en citometría de flujo para la identificación de plaquetas y megacariocitos. Reacciona con una glicoproteína de membrana integral de cadena única de 17-22 kDa, también conocida como GPIX.
- 1 vial de anticuerpo policlonal FITC contra la inmunoglobulina humana total (Anti-Ig totales FITC).
- 1 vial de anticuerpo policlonal FITC contra IgA humana.
- 1 vial de anticuerpo policlonal FITC contra la IgG humana.
- 1 vial de anticuerpo policlonal FITC contra IgM humana.
- 1 vial de anticuerpo policlonal conjugado con FITC contra inmunoglobulinas totales de conejo (anticuerpo de cabra anti-Ig de conejo FITC)
- 2 frascos de solución de Tyrode sin bicarbonato sódico 20X (50 ml).
- 2 frascos de bicarbonato sódico
- 2 frascos de solución de oxalato de amonio, 10X (2 x 25 ml)
- 1 frasco de solución de oxalato de amonio

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Tubos de recogida de sangre que contengan EDTA como anticoagulante.
- 12 tubos de centrífuga de polipropileno de 75 mm
- Solución de fijación: paraformaldehído al 1 %, EDTA 10 mM y BSA al 0,5 % en PBS.
- Micropipeta capaz de dispensar volúmenes de 5 µl, 20 µl, 100 µl y 500 µl
- Serofuge o centrífuga equivalente
- Mezclador Vortex
- Citómetro de flujo con longitud de onda de excitación de 488 nm (láser de iones de argón)

USO RECOMENDADO

«Thrombostep» de Immunostep está diseñado para su uso en la detección y cuantificación mediante citometría de flujo de la inmunoglobulina asociada a las plaquetas.

RELEVANCIA CLÍNICA

La púrpura trombocitopénica inmune (PTI) es un trastorno autoinmune caracterizado por un recuento plaquetario bajo y hemorragias mucocutáneas. Los autoanticuerpos se dirigen principalmente a los receptores plaquetarios específicos CD41a (GPIIb/IIIa) y CD42b (GPIb). Como resultado, las plaquetas sensibilizadas son eliminadas rápidamente por el sistema de células monocito-macrófagas.

La determinación de autoanticuerpos contra las plaquetas permite diferenciar la trombocitopenia inmunitaria de la no inmunitaria.

CONDICIONES ADECUADAS DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACIÓN

Almacenar en la oscuridad, refrigerado entre 2 °C y 8 °C. NO CONGELAR. El anticuerpo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial si se mantiene a 2 °C-8 °C. No utilizar después de la fecha indicada. Una vez abierto el vial, el producto es estable durante 90 días.

SEÑALES DE DETERIORO

No se deben utilizar los reactivos si se observa cualquier indicio de deterioro. Para más información, póngase en contacto con nuestro servicio técnico: tech@immunostep.com
El aspecto normal del producto es el de un líquido semitransparente e incoloro. No debe utilizarse si el medio líquido está turbio o contiene precipitados. Debe ser inodoro.

Revision nr. 4 | Emission date: 18/06/2026 | TDS_TBS

RECOMENDACIONES Y ADVERTENCIAS

a) Los reactivos contienen azida sódica. En condiciones ácidas, se transforma en ácido hidrazoico, un compuesto altamente tóxico. Los compuestos de azida deben diluirse en agua corriente antes de desecharlos. Se recomiendan estas condiciones para evitar depósitos en las tuberías, donde podrían desarrollarse condiciones explosivas. La ficha de datos de seguridad (FDS) es disponible en línea en www.immunostep.com
b) Evite la contaminación microbiana del reactivo.
c) Protéjalo de la luz. Utilice luz tenue durante la manipulación, la incubación con las células y antes del análisis.
d) No pipetear nunca con la boca.
e) En caso de contacto con la piel, lávese con abundante agua.
f) Las muestras deben manipularse de la misma forma que aquellas capaces de transmitir infecciones. Deben garantizarse los procedimientos de manipulación adecuados.
g) No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en el vial.
h) Las desviaciones del procedimiento recomendado podrían invalidar los resultados del análisis.
i) PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.
j) Solo para uso profesional.
k) Antes de obtener las muestras, es necesario asegurarse de que el citómetro de flujo esté calibrado y compensado.

PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE OXALATO DE AMONIO 1X (250 ml)

1. Mida 240 ml de H_2O utilizando un tubo de ensayo o un cilindro graduado.
2. Transfiera el H_2O del tubo de ensayo a un vaso de precipitados limpio.
3. Añada todo el contenido de un frasco de solución de oxalato de amonio.
4. Mezcle suavemente hasta que quede completamente homogéneo.
5. Filtrar a través de una membrana de 0,45 µm en una botella de 500 ml y anotar la fecha de preparación.

Nota: Una vez preparada, la solución de trabajo de oxalato de amonio 1X se mantiene estable hasta un año si se conserva a temperatura ambiente (15–25 °C) en un recipiente bien cerrado.

PREPARACIÓN DE UNA SOLUCIÓN DE TRABAJO DE TAMPÓN DE TYRODE COMPLETO 1X

1. Mide 950 ml de agua destilada o desionizada utilizando un cilindro graduado.
2. Vierte el agua destilada del cilindro graduado en un vaso de precipitados limpio y del tamaño adecuado.
3. Añade cuantitativamente al vaso de precipitados el contenido de 50 ml de un frasco de solución de Tyrode concentrada 20X.
4. Incorpore el bicarbonato sódico de un vial específico a la mezcla y agite o remueva continuamente hasta que el polvo se haya disuelto por completo.
5. Filtre la solución completamente homogeneizada a través de un filtro de membrana estéril de 0,45 µm directamente en un recipiente de almacenamiento limpio de 1 L, y anote claramente la fecha de preparación en la etiqueta del frasco.

Nota: Una vez preparada, la solución de trabajoNota: Preparación del buffer de lavado de Tyrode 1X completo. Y tras añadir bicarbonato sódico, la matriz completa del tampón de Tyrode 1X se mantiene estable hasta 90 días si se conserva a una temperatura de entre 2 y 8 °C. Deseche la solución si observa turbidez o se produce contaminación microbiana de oxalato de amonio 1X se mantiene estable hasta un año si se conserva a temperatura ambiente (15–25 °C) en un recipiente bien cerrado.

TOMA DE MUESTRAS

1. Se extraen 10 ml de sangre periférica con EDTA de cada paciente o control individual. Cada muestra, tanto de los pacientes como de los controles, se divide en dos tubos y se centrifuga sin freno a baja velocidad, a 200 x g durante 10 minutos, para obtener una separación entre el plasma rico en plaquetas y la fracción de células sanguíneas (1,2)

2. Tras la centrifugación, se recoge el plasma rico en plaquetas con una pipeta Pasteur, evitando recoger glóbulos rojos, y el plasma rico en plaquetas se centrifuga con freno a alta velocidad a 900 x g durante 10 minutos. Se decanta el tubo recogiendo el plasma, que se almacena a 4 °C.

El plasma se utilizará para confirmar el resultado obtenido en caso de que sea necesario, utilizando plaquetas de individuos sanos.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Resuspender el sedimento de plaquetas que aparece en el fondo del tubo tras el decantado en 5 ml de oxalato de amonio 1X, incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente. El oxalato de amonio es una solución hipotónica que lisa los glóbulos rojos adheridos a las plaquetas.
2. Tras la incubación, las células se centrifugan a 900 x g durante 10 minutos, se decanta el sobrenadante y se resuspende el sedimento de plaquetas en 3 ml de tampón de lavado.
3. Centrifugar las plaquetas a 900 x g durante 10 minutos y decantar el sobrenadante. Lavar las plaquetas una vez más a 900 x g durante 10 minutos.
4. Resuspender las plaquetas lavadas en 3 ml de paraformaldehído al 1 %, EDTA 10 mM y BSA al 0,5 %. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar las células dos veces con 3 ml de tampón de lavado. Centrifugar las plaquetas a 900 xg durante 10 minutos y decantar el sobrenadante.
6. Resuspender las células en 1 ml de tampón de lavado, contando la concentración de plaquetas en un analizador hematológico o con una cámara de conteo para ajustar la concentración de plaquetas a ≤100 000 plaquetas/µl.
7. Por último, los tubos se almacenan durante al menos 2 horas o una semana a 4 °C para reducir la cantidad de anticuerpos unidos de forma inespecífica.

MÉTODO DE ETIQUETADO DE MUESTRAS

1. Se etiquetan cinco tubos para cada paciente o control (inmunoglobulinas policlonales anti-conejo; inmunoglobulinas policlonales anti-humanas; IgA policlonal anti-humana; IgG policlonal anti-humana; IgM policlonal anti-humana). Se recomienda realizar el etiquetado de las plaquetas con anticuerpos en hielo. Prepare un baño de hielo.

2. Añada 50 µl de muestra de plaquetas o control con Ig anti-humanas a cada tubo.

- Tubo de anticuerpos policlonales anti-conejo: Añada 20 µl de anticuerpos policlonales anti-Ig de conejo marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE
- Tubo de anticuerpos policlonales anti-Ig humanas: Añada 20 µl de anticuerpos policlonales anti-Ig humanas marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE
- Tubo de anticuerpos policlonales anti-IgA humana: Añadir 20 µl de anticuerpos policlonales anti-IgA humana marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE
- Tubo de anticuerpos policlonales anti-IgG humana: Añada 20 µl de anticuerpos policlonales anti-IgG humana marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE
- Tubo de anticuerpos policlonales anti-IgM humana: Añadir 20 µl de anticuerpos policlonales anti-IgM humana marcados con FITC + 20 µl de CD42a PE

3. Agitar con el vórtex e incubar las muestras durante 30 minutos en un baño de hielo a oscuras.

4. Añada 3 ml de tampón de lavado a cada tubo, mezcle las muestras y centrifugue las plaquetas a 900 x g durante 10 minutos. Repita el lavado una vez más.

5. Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 500 µl de tampón de lavado.

6. Analizar mediante citometría de flujo. Si las muestras no se van a analizar inmediatamente, conservarlas en la oscuridad a 2-8 °C.

ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Verifique que el citómetro esté alineado y estandarizado para la dispersión de la luz (FSC/SSC en escala logarítmica) y la intensidad de fluorescencia (FL1, FL2 en escala logarítmica).

Es necesario establecer una región (R1) para seleccionar la población de plaquetas. Establezca la R1 alrededor de la población positiva para CD42a PE (trombocitos). Adquiera al menos 10 000 eventos en la región 1 (R1).

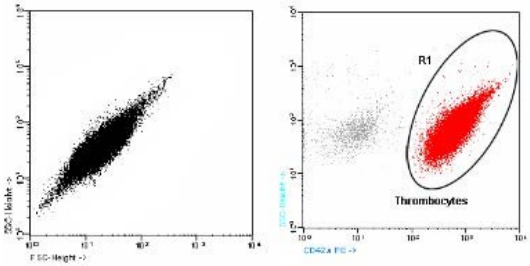
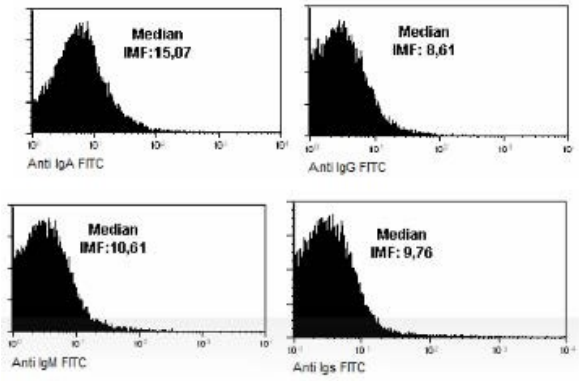


Figura 1. Los trombocitos de control (eventos rojos) son células dentro de la puerta de CD42a (R1). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA).

A



B

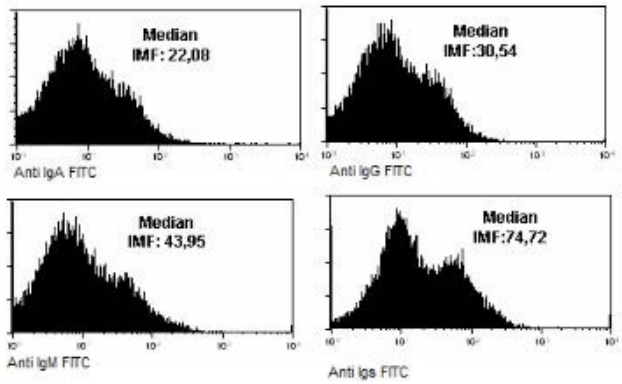


Figura 2. Trombocitopenia inmune. Los histogramas representan la comparación entre una muestra de control sana (A) y una muestra de trombocitopenia inmune (B). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA).

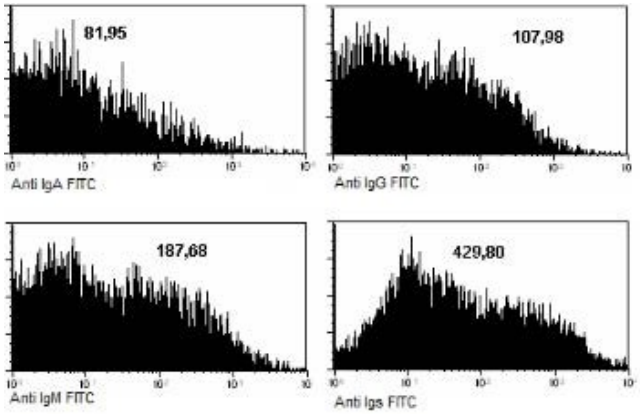


Figura 3. Trombocitopenia inmune. Los histogramas representan una muestra de trombocitopenia inmune. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Los anticuerpos anti-IgA y anti-IgM pueden producir un marcaje inespecífico en la IgG. En caso de que la muestra sea positiva para IgG, IgA e IgM, tenga en cuenta únicamente la primera.
2. La incubación del anticuerpo con las células fuera de los procedimientos recomendados puede provocar una reducción o pérdida de determinantes antigénicos de la superficie celular.
3. Los valores obtenidos en personas sanas pueden variar de un laboratorio a otro; por lo tanto, se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia normal.
4. Las células o líneas celulares anormales pueden presentar una densidad de antígenos mayor que las células normales. En algunos casos, esto podría requerir el uso de una cantidad mayor de anticuerpo monoclonal que la indicada en los procedimientos de preparación de muestras.
5. En las muestras de sangre total, los glóbulos rojos presentes en muestras anormales, así como los glóbulos rojos nucleados (tanto de muestras normales como anormales), pueden ser resistentes a la lisis. Puede ser necesario prolongar los tiempos de lisis de los glóbulos rojos para evitar la inclusión de células no lisadas en la región de selección de linfocitos.
6. Las muestras de sangre no deben refrigerarse durante un periodo prolongado (más de 24 horas), ya que el número de células viables disminuirá gradualmente, lo que puede afectar al análisis. Para obtener los mejores valores, deben mantenerse a temperatura ambiente inmediatamente antes de la incubación con el anticuerpo monoclonal.
7. La precisión de los resultados obtenidos mediante procedimientos de citometría de flujo depende de la correcta alineación y calibración de los láseres, así como de la configuración adecuada de los filtros.

VALORES DE REFERENCIA

Los resultados anormales en el porcentaje de células que expresan el antígeno o en sus niveles de expresión pueden deberse a afecciones patológicas. Es recomendable conocer los patrones normales de expresión del antígeno para garantizar una interpretación adecuada de los resultados (4,5,6).
Porcentaje en sangre periférica de un paciente sano Hemograma: 3,8 - 5,6 × 10^6/µL Plaquetas: 150 - 450 × 10^3/µL

Los valores obtenidos en individuos sanos pueden variar de un laboratorio a otro; por lo tanto, se sugiere que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia normal.

CARACTERÍSTICAS

Valores de la fluorescencia verde de trombocitos teñidos de individuos normales. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA).

Antibody	Green Fluorescence (Median)	Maximium Value	Minium Value	N
Anti-human IgA	29,05	99,74	5,45	17
Anti-human IgG	11,72	72,34	4,43	17
Anti-human IgM	13,89	68,11	5,25	17
Anti-human immunoglobulin	12,37	65,91	3,98	17

Valores de la fluorescencia verde de los trombocitos teñidos de una muestra patológica individual.

Antibody	Green Fluorescence (Median)	Maximium Value	Minium Value	N
Anti-human IgA	144,63	446,30	23,53	15
Anti-human IgG	62,58	457,07	13,83	15
Anti-human IgM	83,54	258,44	20,85	15
Anti-human immunoglobulin	91,49	272,37	17,38	14

ESPECIFICIDAD

Para el ensayo de especificidad del kit, se incubaron Ig antihumanas respectivamente con perlas de poliestireno recubiertas de inmunoglobulinas humanas IgA, IgG e IgM y BSA (control).

El análisis de especificidad de los anticuerpos anti-Ig humanos muestra una reactividad cruzada muy baja (>7 %) para todos ellos (fig. 4), lo que facilita la identificación correcta de las muestras no patológicas.

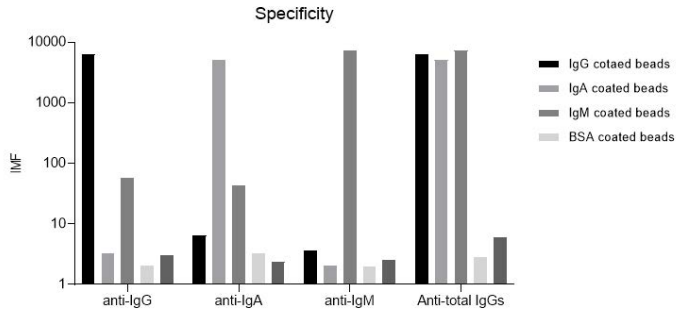


Figura 4: Se analizaron las inmunoglobulinas humanas IgA, IgG e IgM, BSA (control) y perlas de poliestireno recubiertas de conejo mediante el citómetro de flujo FACSAria II (Becton Dickinson, San José, CA).

GARANTÍA

Se garantiza únicamente que se ajusta a la cantidad y al contenido indicados en la etiqueta o en el etiquetado del producto en el momento de la entrega al cliente. Immunostep renuncia por la presente a cualquier otra garantía. La única responsabilidad de Immunostep se limita a la sustitución de los productos o al reembolso del precio de compra.

REFERENCIAS

1. Procedimientos para la obtención de muestras de sangre con fines diagnósticos mediante venopunción: norma aprobada; quinta edición (2003). Wayne, PA: Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico; Documento H3-A5.
2. «Procedimientos estándar para la obtención de muestras de sangre con fines diagnósticos», publicado por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS)
3. Kotylo PK et al. Rangos de referencia para subconjuntos de linfocitos en pacientes pediátricos. Am J Clin Pathol 100:111-5 (1993)
4. Reichert et al. Rangos de referencia de subconjuntos linfocitarios en adultos caucásicos. Clin Immunol Immunopathol 60:190-208 (1991)
5. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, ed. Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Nueva York: Oxford University Press; 1995.
6. CLSI EP09-A3. Comparación de procedimientos de medición y estimación del sesgo utilizando muestras de pacientes; Directriz aprobada - Tercera edición.
7. Rosenfeld, C.S. et al. Medición por citometría de flujo de anticuerpos antiplaquetarios. Am J Clin Pathol 1987, 87: 5841-522.
8. Ault K.A. Medición por citometría de flujo de la inmunoglobulina asociada a las plaquetas. Pathol Immunopathol Res 1988, 7:395-408.

EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS

	Formulario
REF	Referencia de catálogo
Σ	Contiene cantidad suficiente para <n> pruebas
	Cantidad por prueba
	Estado regulatorio
RUO	Solo para uso en investigación
	Fabricante

FABRICADO POR:

Dirección: Avda. Universidad de Coimbra, s/n
Centro de Investigación Oncológica
(C.I.C) Campus de Unamuno
37007 Salamanca (España)

Tel./fax: (+34) 923 294 827
Correo electrónico: info@immunostep.com

www.immunostep.com